Aus dem Physiologisch - chemischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Mikrochirugische Zellkerntransplantationen bei somatischen Säugetierzellen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
vorgelegt von
Adolf Gräßmann
aus
Bad Kissingen

1968

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Physiologisch - chemischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Ernst Schütte

Mikrochirugische Zellkerntransplantationen bei somatischen Säugetierzellen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
vorgelegt von
Adolf Gräßmann
aus
Bad Kissingen

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann

Referent: Privatdozent Dr. med. Dipl. Chem. Peter Schmialek

Korreferent: Professor Dr. med. Willy Schwarz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 09. DEZ. 1968

Inhaltsangabe

0.	Einleitung	1
1.	Material und Methoden	4
1.1.	Arbeitsgerät	4
1.2.	Glaskanülenherstellung	6
1.3.	Gewinnung des Gewebematerials	9
1.3.1.	Neoplastische Zellen für die Zellkerngewinnung	9
1.3.1.1.	Melanomzellen (Harding - Passey - Mäusemelanom)	9
1.3.1.2.	Ascites-Tumorzellen (ADa-Mäuse-Asciteszellen)	10
1.3.2.	Nicht-neoplastische Empfängerzellen	10
1.3.2.1.	Muskelzellen aus embryonalen und adulten Mäusen	10
1.3.2.2.	Riesenzellen aus der Kultur embryonaler Mäusezellen	11
1.4.	Isolierung einzelner Zellkerne aus somatischen Zellen und ihre Transplantation in andere somatische Zellen	12
1.5.	Chromosomendarstellung	15
1.6.	Elektronenmikroskopische Methoden	15
1.7.	Autoradiographie	15
2.	Versuchsbeschreibung und Ergebnisse	16
2.1.	Verhalten der Empfängerzelle nach Anstechen mit der Injektionskanüle	16
2.2.	Verhalten der artifiziellen Mischzelle	17
2.3.	Teilungsfähigkeit des übertragenen Zellkerns	22
3.	Diskussion	28
4.	Zusammenfassung	32
5.	Literaturverzeichnis	33

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0043

0. Einleitung

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet:

An welche Struktur der somatischen Säugerzelle ist die Eigenschaft der Malignität gebunden?

Maligne Zellen sind entartete somatische Zellen im Verband eines differenzierten Gewebes oder in Kulturen von ebenfalls differenzierten Geweben und Einzelzellen. Sie geben ihre Malignität an die Tochtergeneration weiter. Das deutet auf Veränderungen an zellulären Bestandteilen hin, die im engen Zusammenhang mit der Informationsspeicherung und deren Übertragung steht.

Der Zellkern enthält das stoffliche Material für die Replizierbarkeit der Zelle. Wenn die Information für die Malignität stofflich fixiert ist, muß sie übertragbar sein, braucht aber nicht phänotypisch sichtbar zu werden. Werden die zellulären Bestandteile, an die die Information gebunden ist, in eine nicht transformierte Zelle übertragen, so könnte diese Mischzelle ebenfalls neoplastische Eigenschaften zeigen.

Verschiedene Arbeitsgruppen [1,2,] hybridisierten mit aktiven oder inaktivierten Viren maligne und nicht maligne Zellen miteinander. Die Tochtergenerationen aus der Verschmelzung einer malignen und einer nicht malignen Zelle wuchsen nach Transplantation in geeigneten Versuchstieren wie die maligne Ausgangszelle[2]. Damit war gezeigt, daß die normale Zelle die Eigenschaft der Transplantierbarkeit und der Krebsbildung der malignen Zelle in den Tochtergenerationen nicht zu unterdrücken vermag, es konnte aber, da ganze Zellen hybridisiert worden waren , nicht entschieden werden, an welche Zellstruktur die Malignität gebunden war.

Deshalb war der Gedanke der Isolierung eines Zellkerns einer Tumorzelle und deren Übertragung in eine andere somatische, nicht-transformierte Säugerzelle zur Aufklärung des Problems, in welcher Struktur der Zelle die Eigenschaft der Malignität lokalisiert ist, naheliegend.

Kopac [3,4] beschrieb eine Reihe von Injektionssystemen, die über Mikromanipulatoren die Übertragung von Zellpartikeln ermöglichen sollten. Die gelungene

Transplantation eines somatischen Säugerzellkerns in eine andere somatische Säugerzelle wurde nicht publiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde dennoch versucht, mit Hilfe von Glaskanülen Zellkerne aus neoplastischen Säugetierzellen zu isolieren und in nicht-transformierte somatische Säugerzellen zu übertragen. Voraussetzung zur Klärung der Aufgabenstellung war die BEantwortung der folgenden vier Fragen :

1. Überlebt die Empfängerzelle die mechanische Verletzung, die eine mikrochirurgische Einpflanzung eines Zellbestandteils verursacht ?
2. Überlebt die Mischzelle die räumliche und die stoffliche Integration eines fremden Partikels ?
3. Überträgt der eingpflanzte Zellkern eine oder mehrere Eigenschaften auf die Empfängerzelle und übernimmt die Empfängerzelle permanent diese Eigenschaften ?
4. Bleibt die Teilbarkeit des eingepflanzten Zellkerns in der Empfängerzelle erhalten ?

Das Verhalten von somatischen Zellen nach mechanischer Verletzung beschrieben schon 1927 Peterfi und Olivo [5] . Die Autoren zeigten , daß einzelne Zelllen in Kultur Incisuren in Zellmembran und Cytoplasma überleben, solange die Kernmembran nicht verletzt wird. Ihre Ergebnisse wurden von Munro und Daniel [6] bestätigt. Goldstein, Cailleau und Crocker [7] fanden darüber hinaus, daß nach mikrochirurgischer Amputation eines Zellausläufers der kernhaltige Zellanteil die Verletzung verschließt , solange der Schnitt nicht größer als 5 mü ist. Der kernlose Anteil nimmt kugelige Gestalt an und löst sich im Laufe von zwei Stunden auf. Oft tritt kurz nach der Verletzung eine Mitose in dem kernhaltigen Anteil auf.

Hinweise auf die räumliche und funktionelle Integration einzelner Kerne in andere Zellen fanden sich in den Arbeiten mehrerer Autoren [8, 9, 10] . Barski beobachtete, daß in dichtgewachsenen Mischkulturen zweier Zellstämme vereinzelte Übergänge von Kernen in eine andere benachbarte Zelle

vorkommen. Briggs, King, Gurdon und Mitarbeiter [9],[10] ersetzten den Kern eines Froscheies durch den Zellkern aus einem Froschkeim. Unter gewissen Bedingungen entwickelte sich dieses Ei zum adulten Frosch. Größe und Differenzierungsgrad des Froscheies und Keimes sind aber mit somatischen Säugetierzellen nicht zu vergleichen. Zur Beantwortung der vier eingangs gestellten Fragen wurden aus experimentellen Gründen folgende Zellen verwendet: Quergestreifte Muskelzellen und embryonale Riesenzellen aus der Zellkultur von Mäusen als nicht-transformierte Empfängerzellen und Zellen aus Harding-Passey- Mäusemelanoms und des Mäuse-Ascites EDa-Stammes als Spender des neoplastischen Kernes. Beide Empfängerzellen besitzen ein großes Plasmavolumen und bieten damit eine günstige räumliche Voraussetzung für die mechanische Übertragung von Zellkernen. Das Verhältnis der Größe des übertragenen Zellkernes (4-5 mü) zur Größe des Plasmas der Empfängerzelle (30-50 mü) ist für die räumliche Integration des fremden Kernes eine Voraussetzung. Das Harding-Passey-Melanom eignet sich als Kernspender zur Beantwortung der Fragen zwei und drei, da die Pigmentbildung durch diese Kerne ein leicht verfolgbarer Parameter für eine - allerdings indirekte - Kernleistung ist. Die Beobachtung der Pigmentvermehrung nach Implantation eines Melanomzellkernes in eine einzelne Muskelzelle kann über einen langen Zeitraum erfolgen, da die Muskelzelle sich nicht teilt.

Im Gegensatz zu den Kernen der Muskelzelle teilen sich die Kerne der embryonalen Riesenzellen in Kultur [11]. Da eine nur auf morphologischen Kriterien beruhende Identifizierung der transplantierten Kerne und der Riesenzellkerne nicht sicher genug ist, wurden zur eindeutigen Beantwortung der Frage vier die Zellkerne des Ascites-Tumors-EDa in die embryonale nicht-permanente Riesenzelle übertragen. Die Kerne dieses Zellstammes besitzen in ihrem Chromosomensatz ein charakteristisch gestaltetes Marker-Chromosom. Sein Auftreten in einer Riesenzelle nach Transplantation des EDa-Kernes beweist den Beginn einer Mitose und damit die Fortsetzung der Teilungsfähigkeit des übertragenen neoplastischen Kernes in der primär nicht-malignen-artifiziellen somatischen Mischzelle.

1. Material und Methoden

1.1. Die Arbeitsgeräte

Für die Durchführung der Versuche wurden folgende Instrumente verwendet:

a) Der Mikromanipulator der Firma Leitz für die Führung der zur Gewinnung und Übertragung von Zellkernen benutzten Glaskapillaren. Dieser Manipulator besteht aus einer Grundplatte und zwei Manipulatoren, die alle Bewegungsrichtungen außer der Rotationsbewegung erlauben. Dieses Gerät wird ohne weitere Veränderungen für die Experimente verwendet.

b) Ein umgekehrtes Mikroskop (Plankton-Mikroskop, Firma Zeiss, Oberkochem) für die Beobachtung nativer Zellen in den Kulturgefäßen (Bellco-Röhrchen). Das Mikroskop vergrößert 1 : 125 fach.

c) Mikroskop Ortholux der Firma Leitz mit Photographiereinrichtung, Phasenkontrastsystem, Objektive mit einem ausreichend weiten Arbeitsabstand von 4,5 mm (Objektiv UOII/0,25 mm) und einem thermostatierbaren Arbeitstisch (Sollwert der Arbeitstemperatur $37^{o}C \pm 0,1^{o}C$). Das Mikroskop erlaubt eine Vergrößerung von 1:125 bei der Beobachtung nativer Zellen in den Zuchtschalen mittels Hellfeld, von 1:125 mittels Phaco und von 1:1250 bei gefärbten Präparaten im Hellfeld und mit Ölimmersion.

d) Die in der Literatur beschriebenen Zuchtschalen für Einzelzellen (z.B. 12) waren für die hier geschilderten Versuche ungeeignet. Die schließlich verwendeten Zuchtgefäße für die Kerntransplantation in einzelne Muskelzellen bestanden aus einem 3,5 mm starken Objektträger mit einer im Zentrum 1,5 mm tiefen Kehle von 20 mm Durchmesser. 1,0 mm tiefe und 20 mm lange Einschnitte laufen radial auf die Kehle zu, die später die Muskelzelle enthält. Nach der Transplantation des Kernes in die Empfängerzelle wird die Kehle mit einem Deckglas und einem Filterring steril abgedeckt und mit einem sterilen Vaseline-Paraffingemisch (1 : 1 V/V) abgedichtet. Der Hohlraum der Kehle wird

mit einer V2A Kanüle Nr. 23 luftblasenfrei durch die Einschliffe hindurch mit Medium gefüllt. Die Einschliffe werden mit dem Vaseline-Paraffingemisch verschlossen. Diese Anordnung (Abb. 1) gestattet die Beobachtung und photographische Aufnahme vitaler Zellen mit einer Vergrößerung von 1 : 125. In keinem einzigen Versuch wurde die Infektion eines solchen Ansatzes festgestellt.

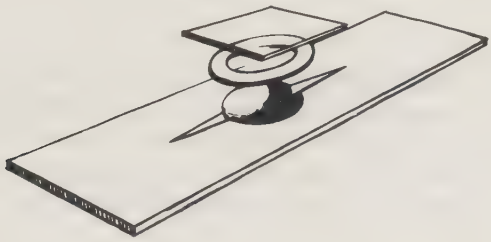

Abb. 1 Zuchtschale

e) Belco - Röhrchen[x)] für die Kultivierung von Zellen mit der Möglichkeit, die Zeller im umgekehrten Mikroskop zu beobachten.

f) Die Entnahme eines Kernes aus einer Zelle und die Transplantation in eine Riesenzelle wird in einer sogenannten Injektionskammer durchgeführt.

Diese besteht aus einem flachen, rechteckigen, oben offenen Gefäß (7 x 5 cm), das durch eine längslaufende Trennwand in zwei gleiche Hälften geteilt ist, die - mit Medium gefüllt - je einen Objektträger mit den auf ihm angewachsenen unterschiedlichen Zellstämmen aufnehmen. Die Wände der Kammer bestehen aus Plexiglas. Sie sind mit Chloroform aneinandergeklebt. Die so hergestellten Injektionskammern erfüllen folgende unabdingbare Voraussetzungen: Sie sind durchsichtig und erlauben daher eine Kontrolle des Transplantationsvorganges im Durchlicht, sie geben aus dem Kunststoff keine zelltoxischen Substanzen an das Medium ab, sie lassen sich mit den in der Zellkultur üblichen Wasch-

x) Belco - Glass Inc. P.O. Box B. Vineland New Jersey 08360

lösungen reinigen und 2 Stunden lang bei 120 ^{o} C sterilisieren.

g) EK-Filter (Gr. 22/1) der Firma Zeiss zur Ultrafiltration der in der Zellkultur verwendeten Nährmedien.

h) Die bei der Kultur der Zellen verwendeten Geräte werden mit folgenden Lösungen gereinigt und sterilisiert:

Glasmaterial:

1. Prillösung für 12 Stunden (3Gramm/Liter Wasser)
2. Auswaschen in fließendem Leitungswasser für 24 Stunden
3. Nachwaschen in Jonenaustauscherwasser für 12 Stunden
4. Sterilisation im Hochdruck Dampfsterilisator bei 120^{o}C und gespannten Dampf für 30 Minuten.

1.2. Glaskanülenherstellung

Die Glaskanülen werden aus Glasrohren x) mit einem Außendurchmesser von 1,4 mm, einem Innendurchmesser von 1.0 mm und einer Länge von 20 cm hergestellt. Die Röhrchen werden gewaschen (etwa 12 Stunden Nitriergemisch, 24 Stunden destilliertes Wasser, 12 Stunden bidestilliertes Wasser) und danach 12 Stunden bei 150 ^{0} C getrocknet. Eine zu lang ausgezogene Kanülenspitze ist elastisch und behindert das gezielte Anstechen der Zelle, eine zu kurze bricht leicht ab. Die folgende Methode ergibt eine brauchbare Kanülenform. Über der Sparflamme eines Bunsenbrenners wird das Glasröhrchen von Hand so ausgezogen, daß es über einen Zentimeter einen Durchmesser von etwa 0,3 mm erhält. Das vorgezogene Glasröhrchen wird zwischen zwei Gleitschlitten auf eine Schiene gespannt, die von Federn auseinandergezogen wird. Der dünne Teil des Röhrchens liegt dabei in einer heizbaren Platindrahtschlinge. Wenn die Schlinge erhitzt und der Glasschmelzpunkt erreicht wird, ziehen die Federn die Hälften des Röhrchens zu zwei gleichen Kanülen aus.

---

x) Scientific Glass Apparatur Company, 1000 Lakewood Terr. Platform No. 7 Bloomfield N. J. USA

Der gewünschte Kanülendurchmesser ist von der Geschwindigkeit abhängig, mit der der Schmelzpunkt erreicht wird. Eine Stromstärke von 8 - 10 Ampere ergibt in der hier beschriebenen Anordnung einen Kanülendurchmesser von 4 - 5 mü (siehe Abb. 2).

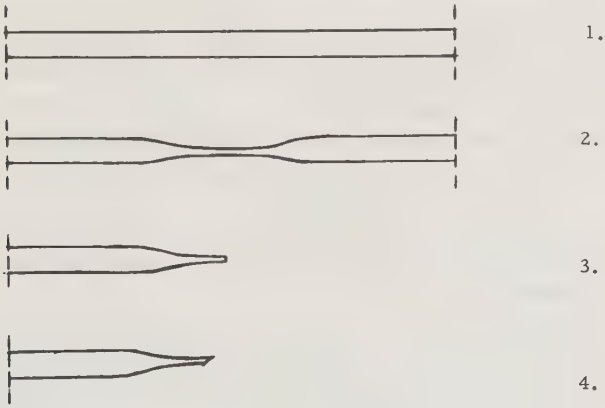

Abb. 2

1. Glasrohr, 2. Glasrohr vorgezogen, 3. Kanüle ausgezogen, 4. Kanüle angeschliffen

Nach jedem Ausziehvorgang werden die Kanülen unter dem Mikroskop auf Form und Größe geprüft und die Heizschlinge dementsprechend nachreguliert. Zum Anschleifen der Spitze wird die Kanüle mit Hilfe einer Haltevorrichtung in einem Winkel von 45° auf eine plangedrehte Metallscheibe von 150 mm Durchmesser, die mit einem dünnen Film Diamantpaste x) überzogen ist, aufgesetzt. Die Metallscheibe ist schlagfrei auf einer Motorachse befestigt (1500 U/Min.). Die Schleifmaschine steht auf einem schwingungsfreien Wägetisch. Unter Kontrolle eines Biokulars wird die Kanüle geschliffen. Nach 10 Minuten Schleifzeit wird die Spitze in Nitriergemisch und anschließend Wasser gereinigt. Hierzu wird die Flüssigkeit mittels eines Plastikschlauches und einer Rekordspritze von der Kanülenspitze her eingesogen.

---

x) Diaplast 0,25 - N, Firma Winter Diaplast Ernst Winter und Sohn, Hamburg 19.

Nach der Reinigung wird die Kanülenspitze für den Einstich wie folgt präpariert:

1. Einmaliges Aufziehen und Ausdrücken von Fluorwasserstoffsäure (Riedel de Haen AG 01711)
2. Reinigung mit Wasser
3. Aufziehen und Ausblasen von Äthanol
4. Aufziehen und Ausblasen von trocknem Tetrahydrofuran
5. Aufziehen und Ausblasen von 5 % (V/V) Dichlordimethylsilan in trocknem Tetrahydrofuran
6. Wiederholtes Ausspülen in trocknem Tetrahydrofuran und anschließend in Äthanol
7. Sterilisation bei 150 ^{o} C im Trockenschrank während einer Stunde.

Versuche, die Kanülen auf eine andere Weise zu hydrophobieren und damit die Glasoberfläche zu inaktivieren (Veräthern mit Trimethylchlorsilan, Imprägnieren mit Paraffinöl, Siliconöl Bayer M 100 und M 300 oder Celloidin, Ersetzen der unter 1 aufgeführten Oberflächenätzung durch Bildung eines oberflächlichen Glasgels mit Hilfe von heißem Wasserdampf) Methoden, die schon zum Teil in der Literatur vorgeschlagen sind, führten nicht zum gewünschten Effekt. Erst das Anätzen mit Fluorwasserstoffsäure ermöglichte eine bessere Vernetzung der Glasoberfläche der Kanülenspitze mit Dichlordimethylsilan. An Kanülen, die nicht in dieser Weise präpariert werden, bleiben beim Anstechen von Zellen Teile des Zellinhaltes und der Zellmembran haften. Dadurch wird die Verletzung der Zelle größer als notwendig. Wenn aber der Anstichkanal und die Lochgröße in der Zellmembran beim Anstechen wesentlich kleiner als die Kanülenspitze bleiben, verschließen sich die Öffnungen nach Entfernen der Kanüle sofort, und es ist lichtmikroskopisch kein Defekt mehr an der Zellmembran zu erkennen. Die Zellmembran wird beim Eindringen der angeschliffenen Kanüle vermutlich elastisch gedehnt.

Gewinnung des Gewebematerials

1.3.1 Neoplastische Zellen für die Zellkerngewinnung

1.3.1.1. Melanomzellen:

Für die Versuche über die Integrierbarkeit von zellfremdem Material und für den Nachweis der Erhaltung der zellkernspezifischen Funktion in der Empfängerzelle (siehe Seite 2) dienten Zellen des Melanosarkoms (Harding-Passey-Melanom der Maus, von Herrn Dr. Steinhoff, Firma Bayer Leverkusen, freundlicherweise für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt).

Zur Erhaltung und Weiterzucht des Melanosarkoms wird der Tumor sowohl Mäusen subcutan implantiert als auch in Gewebskulturen gehalten. Für die Gewebskultur werden die Tumoren mit der Schere zerkleinert und anschließend trypsiniert [14,15]. Die Einwirkungsdauer der Trypsinlösung beträgt 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit liegt das Gewebe fast nur noch in Form von Einzelzellen vor. Die Zellsuspension wird anschließend bei 0° C 30 Minuten lang mit 50 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die sedimentierten Zellen zur Entfernung des restlichen Trypsins zweimal vorsichtig mit Puck-Medium gewaschen. 2,5 ccm dieser Zellsuspension werden in der Konzentration von 10^5 Zellen /ccm Medium in Belco-Röhrchen, die mit einem Objektträger beschickt sind, eingesät. Das Nährmedium N 16 XTC nach Puck [16] erwies sich gegenüber den Medien nach Eagle (L 10 x TC) [17] und Hanks [18] für die Zucht der Melanomzellen als besonders geeignet. In diesem Medium beträgt die Anwachsrate 5 %, die Generationsdauer 36 Stunden, 2 Tage nach dem Anwachsen bestimmt. Mit zunehmender Kulturdauer verringert sich die Anzahl der Teilungen und hört am 24sten Tag fast ganz auf, während im gleichen Zeitraum die Zellen soviel Pigment bilden, daß die meisten Einzelzellen bis zum 24. Tag intensiv-braun-schwarz gefärbt sind. (Dr. Schachtschabel, Marburg zeigt in einer noch unveröffentlichten Arbeit, daß die Abnahme der DNS-Synthese für Zellen des Harding-Passey-Melanoms proportional der Pigmentzunahme geht.

Für die Erhaltung des Zellstammes in Mäusen werden Tumorstücke ($5mm^2$) Mäusen des Stammes NMRI in Äthernarkose nach operativer Eröffnung der

Rückenhaut subcutan eingepflanzt. Die Wachstumsdauer des Implantats beträgt vier Wochen. Nach dieser Zeit ist der Tumor so groß geworden, daß die Tiere getötet werden müssen. Das gewonnene tumoröse Material wird weiter gezüchtet. In 90 % der Sektionen handelt es sich um solide Tumoren. Bei 10 % der Tiere treten neben den Implantationstumoren auch Metastasen auf.

1.3.1.2 Ascites Tumorzellen

Für die Untersuchung der Teilungsfähigkeit der übertragenen Zellkerne (siehe Seite 22) wird der in Kultur und bei Mäusen intraperitoneal gehaltene Mäuse-Ascites-Tumorzellstamm EDa verwendet. Die Zellen dieses Stammes wurden von Dr. Schachtschabel, Marburg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Zellstammerhaltung erfolgt in Mäusen intraperitoneal. Hierfür ist notwendig, alle 20 Tage die aus der Maus gewonnenen Zellen erneut auf Mäuse zu übertragen. Für den Versuch der Kernübertragung wird eine Ascitesmaus getötet und die Asciteszellsuspension steril mit einer 20 ccm Spritze entnommen. Anschließend wird die Zellzahl auf 5×10^5 Zellen/ml mit Eaglemedium eingestellt. Zur Züchtung der Zellen kommen 2,5 ml dieser Zellsuspension in je ein Belco-Röhrchen. Nach 25 Stunden bei 37 $^{\circ}$ C sind die Zellen auf dem Objektträger im Belco-Röhrchen angewachsen. Das pH-Optimum für das Zellwachstum ist 7,2. Die Generationsdauer der Ascites-Tumorzellen EDa beträgt im statistischen Mittel 23,8 Stunden, die Anwachsrate bei einer Einsaatkonzentration von 10^5 Zellen/ml 0,86%. Für die Kerntransplantation werden Kerne aus 2Tage alten Zellkulturen verwendet.

1.3.2 Nicht-neoplastische Empfängerzellen

1.3.2.1. Muskelzellen

Als Empfängerzellen für die Übertragung von Melanosarkom-Zellkernen werden quergestreifte Muskelzellen aus den Mäusen des Stammes NMRI verwendet. Einzelne Muskelzellen können mit der Trypsinmethode (siehe Seite 11) oder mechanisch aus dem Gewebe isoliert werden. Die zweite Methode ist vorzuziehen, weil die tryptische Desaggregation der Gewebe zur Gewinnung einzelner Zellen einen großen Arbeitsaufwand erfordert und die Membran von Muskelzellen nach Trypsinierung gegen mechanische Beanspruchung empfindlicher wird.[20]

Für die mechanische Isolierung werden aus dem frei präparierten Thorax einer getöteten Maus zwei gegenüberliegende Rippen mit der dazugehörenden Intercostalmuskulatur herausgeschnitten und auf einem sterilem Stück Silicongummi - das in einer Schale mit Medium liegt - mittels Metallnadeln befestigt. Unter einer Biokularlupe wird die Muskulatur mit zwei an Glasstäben befestigten Nadeln gespreitet. Die auf diese Weise dargestellten einzelnen Muskelfasern werden von der restlichen Muskulatur stumpf abpräpariert, am Sehnenansatz abgeschnitten und zur weiteren Kultivierung und Verwendung in einen gekehlten Objektträger gebracht. Erst nach etwa 20 Tagen Kulturzeit bei 37° C ist ein Mediumwechsel (sichtbar durch den pH-abhängigen Farbumschlag des Nährmediums)erforderlich.

1.3.2.2. Riesenzellen aus der Kultur embryonaler Mäusezellen

Zur Gewinnung embryonaler Kulturen werden einer getöteten,tragenden Maus (Stamm NMRI) etwa 16 Tage alte Embryonen operativ entnommen und mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Um den größten Teil der Erythrocyten aus den Gewebestücken zu entfernen, werden sie so lange in einer Petrischale mit Trypsinlösung ausgewaschen, bis die Lösung nicht mehr rot gefärbt ist. Die embryonalen Zellen erhält man nach Behandlung der Gewebsstücke mit Trypsin unter Rühren bei Zimmertemperatur während 30 Minuten [21]. Das Gemisch aus Trypsin, Gewebsstücken und Einzelzellen wird dann über ein dreifach gelegtes Mullfilter filtriert, wobei die nicht desaggregierten Stücke der Gewebe auf dem Filter zurückbleiben. Das Filtrat wird bei 50 g und 0° C 30 Minuten lang zentrifugiert. Hierbei setzen sich die Zellen am Boden des Zentrifugenglases ab. Das Trypsin wird abdekandiert und die Zellen zweimal vorsichtig mit Eaglemedium überschichtet , um das restliche Trypsin zu entfernen. Die Zellen werden in Belco - Röhrchen mit 2,5 ml Eaglemedium in einer Anfangskonzentration von $5x10^5$ Zellen /ml , die sich für die Entwicklung von Riesenzellen am günstigsten erwiesen hat, eingesät. Beträgt die Zellkonzentration bei der Einsaat mehr als 5×10^5 Zellen /ml so werden die Riesenzellen überwachsen. Bei einer niedrigeren Zellkonzentration entstehen oft keine Riesenzellen. Um einen pH - Wert von 7,2 im Eaglemedium zu erhalten, werden die Belco-Röhrchen vor dem Verschließen mit 5% CO_2, 20% O_2, 75% N_2 begast[19]. Nach 24 Stunden Kulturzeit haftet ein Teil der Zellen auf dem Objektträger im Belco-Röhr-

chen und nach weiteren 24 Stunden zeigen sich Teilungsstadien und Zellen von besonderer Größe (Durchmesser bis 80 mü). Bei diesen Riesenzellen handelt es sich um mehrzellkernige Gebilde, die sich nach einer Kulturzeit von durchschnittlich vier Tagen wieder in eine Anzahl kleinerer Einzelzellen umwandeln können[11].

1.4 Isolierung einzelner Zellkerne aus somatischen Zellen und ihre Transplantation in andere somatische Zellen.

Die Spender-Zellkerne werden mit Hilfe einer Kanüle aus Glas, deren Herstellung oben beschrieben wurde, unter Sichtkontrolle (Ortholux-Mikroskop mit Heiztisch) bei einer Vergrößerung von 1 : 125 aus den Spenderzellen entnommen und in die Empfängerzellen injiziert. Mikroskop, Arbeitstische und Arbeitsraum müssen vor der Übertragung für 5 Stunden mit UV bestrahlt werden. Alle Arbeiten dürfen nur unter sterilen Bedingungen ausgeführt werden. Damit Spender- und Empfängerzellstamm sich nicht vermischen können, werden sie auf 2 Objektträgern getrennt in den beiden Kammern einer Injektionskammer (siehe oben) gehalten. Ein Kreuztisch verschiebt die Schalenklammern im Blickfeld des Mikroskops. Eine an eine Saug- und Druckvorrichtung angeschlossene vorbereitete Glaskanüle wird mit Hilfe des Mikromanipulators an eine Kernspenderzelle herangeführt. Sie durchsticht die Zellmembran und saugt den Kern in die Kanülenspitze ein. Während der kurzen Zeit des Durchdringens der Kanüle durch die Zelle bis zum Zellkern wird durch einen minimalen Druck (erzeugt durch die angeschlossene Druck-Saugeinrichtung) das Einfließen von Zytoplasma in die Kanüle verhindert. Der innere Kanülendurchmesser ist 0,5 - 1,0 mü kleiner als der Zellkerndurchmesser, damit außer dem Zellkern möglichst wenig Zytoplasma beim Einsaugen in die Spitze der Glaskanüle eindringen kann. Das Zytoplasma bildet dabei eine kugelförmige Schutzhaube vor der Kanülenspitze gegen einen Kontakt des Kernes mit Nährmedium, das für den "nackten" Kern toxisch sein soll [22, 39] und gegen sein Austrocknen während des Überführens in die zweite Schalenkammer, die die Empfängerzellen enthält. Vor dem Einstechen der Kanüle in die Empfängerzelle wird mit einer zweiten Kanüle der Zytoplasmatropfen und die Spenderzellmembran abgesaugt. Die Empfängerzelle wird mit der Kanüle, in der sich der Spenderkern befindet,

angestochen und dieser aus der Kanülenspitze über das Druck- und Saugsystem ausgedrückt. Muskelzellen, die im Gegensatz zu den Melanom-EDa-Ascites - und embryonalen Riesenzellen nicht an der Glasoberfläche anwachsen, müssen während der Kerninjektion mit einer Haltekanüle fixiert werden. Nach Entfernen der Injektionskanüle ist optisch kein Stichkanal und keine Membranläsion in der Empfängerzelle nachweisbar. Die Struktur und damit auch die Menge des am transplantierten Kern hängenden Nicht-Kern-Materials zeigt die photographische Aufnahme eines mit Hilfe der Injektionskanüle isolierten Kernes (Bild Nr. 1). Zur Fixierung des isolierten Zellkernes dient eine Muskelzelle, dies ist erforderlich, um einen einzelnen Zellkern für die elektronenmikroskopische Präparation leichter auffinden zu können. Zum Vergleich des Reinheitsgrades der gewonnenen Zellkerne zeigt Bild 2 durch Ultrazentrifugation dargestellte Zellkerne. Diese Abbildung ist aus der Literatur entnommen. Den Vorgang der Transplantation eines Zellkernes in eine Muskelzelle zeigen die Bilder 3-6.

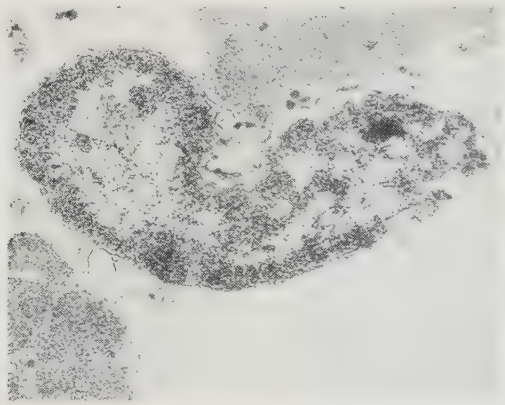

Bild Nr. 1:
Muskelzelle mit implantiertem Melanomzellkern, elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 1 : 6000.
Der Zellkern ist die nierenförmige Fläche in der Mitte des Bildes. Die Flächen oberhalb des Kernes und unten links sind Teile einer Muskelzelle. Die Kernmembran ist am rechten Pol durch das Schneiden (Dicke des Schnittes 200 Å) verletzt worden. Am übrigen Teil der Kernmembran befinden sich kleine Reste des endoplasmatischen Retikulums der Spenderzelle.

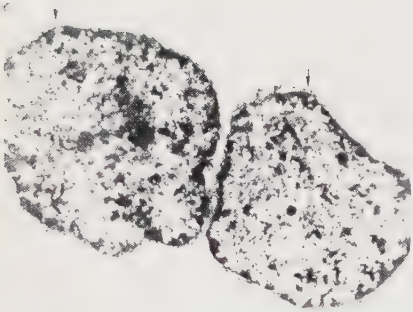

Bild Nr. 2
Zellkerne durch Ultrazentrifugation gewonnen (aus einer Arbeit von Potter R. in Science Vol. 154 S. 1662, 1966 entnommen). Die Pfeile weisen auf Reste von endoplasmatischem Retikulum an der Kernmembran hin.

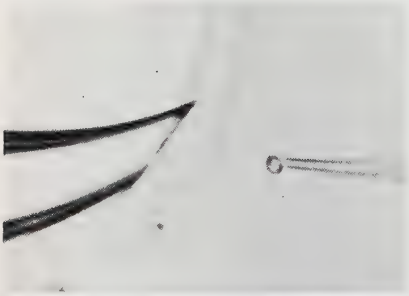

Bild Nr. 3
Muskelzelle mit Haltekanüle, Injektionskanüle mit eingesaugtem Zellkern und Zytoplasma als Schutzhaube,
Hellfeldaufnahme mit Grünfilter,
Vergrößerung 1 : 125.

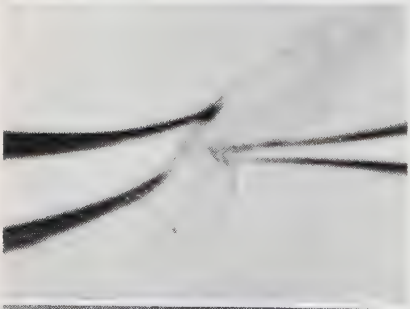

Bild Nr. 4
Muskelzelle mit eingestochener Injektionskanüle,
Hellfeldaufnahme mit Grünfilter.
Vergrößerung 1 : 125

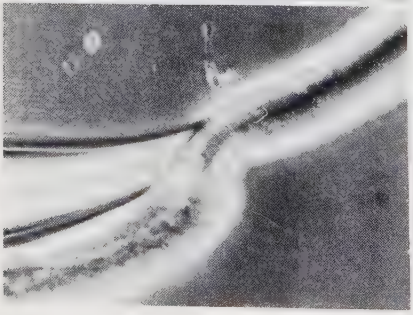

Bild Nr. 5
Muskelzelle mit Haltekanüle nach Entfernen der Injektionskanüle,
Phasenkontrastaufnahme
Vergrößerung 1 : 125

1.5 Chromosomendarstellung

Um Teilungen des übertragenen Zellkernes nachweisen zu können, ist die Darstellung der Chromosomen der artifiziellen Mischzellen notwendig. Dafür werden diese Zellen nach der Implantation des Spenderzellkernes für vier Stunden mit einem in Eaglemedium gelösten Mitosehemmer (10^{-5} molar Colcemid der Firma Ciba [23]) überschichtet. Danach wird die überstehende Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und das Präparat 30 Minuten lang mit einer hypotonen 0,7 % igen Natriumcitratlösung versetzt. [24] Die hypotone Lösung läßt die Zellen platzen und sprettet die Chromosomen. Anschließend werden die Zellen unter dem Mikroskop mit einem Gemisch Äthanol : Eisessig = 3 : 1 während 30 Minuten fixiert und mit einer 1 % igen Orceinlösung in Eisessig gefärbt [24].

1.6 Elektronenmikroskopische Methoden

Die Zellen werden für die elektronenmikroskopische Darstellung folgendermaßen präpariert:

Eine Stunde Fixation mit 1 % igem OsO_4 in isotoner Veronalacetatpufferlösung von pH 7,2. Einbettung in Vestopal (Firma Jäger, Schweiz). Die Blöcke werden mit dem Elke-Servall-Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 200 - 700 A^{o}) und mit Uranylacetat und Bleiacetat kontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden mit dem Siemens Elektronenmikroskop I durchgeführt x).

1.7 Autoradiographie

Als weiterer Beweis für die Teilbarkeit des übertragenen Zellkerns in der entstandenen Mischzelle werden EDa Zellkulturen (in Belco Röhrchen) mit ^{3}H Thymidin (3müc/ml Eaglemedium) für 24 Stunden überschichtet. Zum Entfernen des nicht eingebauten radioaktiven Thymidins, werden die Zellen für 30 Minuten mit nicht markiertem thymidinhaltigem Medium (0,3 mg/ml Thymidin in Eaglemedium) versetzt[25]. Die Übertragung erfolgt nach der auf Seite 12

---

x) Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Herstellung der Schnitte werden von Herrn Priv. -Doz. Dr. J. Merker , Berlin ausgeführt.

beschriebenen Methode. Die embryonale Kultur mit der Mischzelle wird für weitere 20 Stunden bei 37 ^{o} C kultiviert. Dann erfolgt eine Behandlung der Zellen in der folgenden Weise:

1. Überschichten der Zellen mit einer hypotonen wässrigen 0,7%igen Natriumcitratlösung während 25 Minuten.
2. Fixierung des Präparates mit einem Gemisch von Alkohol-Eisessig 3 : 1 für 20 Minuten.
3. Färbung der Zellen mit 1 % iger Orceinlösung.
4. Auflegen des Autoradiographiefilms [26] Kodak AR 10 bei Rotlicht, Birne 15 Watt, Arbeitsabstand 60 cm. Um beim Auflegen des Films ein Schrumpfen zu vermeiden, wird dem Wasser 1 % Glyzerin (V/V) zugesetzt.
5. Exposition bei + 2^{o} C in der Kühlkammer für 8 Tage
6. Entwicklung bei 15 ^{o} C mit Kodak D 19b Entwickler
7. Fixierung mit Kodak Unifix

2. Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

2.1 Verhalten der Empfängerzelle nach Anstechen mit der Injektionskanüle

Zur Beantwortung der Fragestellung 1, die Verletzbarkeit der Zelle, werden Muskelzellen und embryonale Riesezellen mit einer vorbehandelten Glaskanüle angestochen. Hierbei zeigen sich die folgenden Ergebnisse:

Muskelzellen:
Werden quergestreifte Muskelzellen (das gleiche Verhalten zeigen auch Herzmuskelzellen) mit einer Glaskanüle angestochen (Einstichtiefe 7 - 10 mü), so lassen sich diese Zellen nach Entfernen der Kanüle weiter kultivieren, ohne daß lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Veränderungen, verglichen mit nicht angestochenen Muskelzellen, zu beobachten sind. Nur in einem Fall zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von einer angestochenen Herzmuskelzelle Veränderung an den Innenmembranen der in unmittelbarer Umgebung der Einstichstelle (die Einstichstelle wird nach dem

Anstechen in einer Zeichnung festgehalten) liegenden Mitochondrien. Die Cristae-mitochondriales lösten sich auf, während die äußere Membran der Mitochondrien unverändert blieb. Die Kultur der angestochenen Muskelzellen wird nach 30 Tagen abgebrochen.

Embryonale Riesenzellen:

Beträgt die Anstichtiefe 5 - 7 mü, bleibt die Riesenzelle (Durchmesser der Kanüle 4 - 5 mü) unverändert und verhält sich lichtmikroskopisch wie eine nicht angestochene Riesenzelle. Bleiben an der Kanüle, durch falsche Vorbehandlung derselben, Teile der Zellmembran hängen, so nimmt die Zelle sofort nach Entfernen der Kanüle kugelige Gestalt an und löst sich in kürzester Zeit total auf. Der Auflösungsvorgang dauert etwa 2 - 3 Minuten. Bei einer Einstichtiefe von über 10 mü treten in etwa 70 % der Fälle verfrühte Kernteilungen auf. Diese Teilungen erfolgen etwa bis vier Stunden nach Entfernung der Kanüle aus der Zelle, die frühesten Teilungen schon nach 30 Minuten. In einigen Fällen (etwa 5%) ist auch eine totale Zellteilung zu beobachten. Die Zellen werden unter dem Mikroskop bei 125 facher Vergrößerung 24 Stunden lang beobachtet.

Für diese Versuchsreihe wurden 50 quergestreifte Muskelzellen, 20 Herzmuskelzellen und 50 Riesenzellen mit einer Glaskanüle angestochen und licht - und elektronenmikroskopisch untersucht.

2.2. Verhalten der artifiziellen Mischzelle

Implantation eines Zellkerns einer neoplastischen Melanomzelle (Harding-Passey-Mäusemelanom) in eine nicht-maligne Muskelzelle (Fragestellung 2 und 3)

Die Implantation eines Zellkerns in eine Muskelzelle zeigen die Bilder 3 - 5. Der übertragene Kern ist nach dem Entfernen der Kanüle nur noch für wenige Minuten lichtmikroskopisch zu sehen. Danach ist seine Lage nur noch an einer dunkleren Verfärbung der Muskelfaser im Bereich der Injektionsstelle erkennbar. (Nach der Injektion des Zellkerns wird sofort eine Handskizze von der Zelle angefertigt). Eine solche Muskelzelle wird 50 Tage bei 37° C in einem gekehlten Objektträger gehalten und zweimal täglich lichtmikroskopisch beobachtet. Dabei zeigt sich schon nach dem zweiten Tag eine Pigmentierung des Zytoplasmas an der Stelle, an der der Melanomkern ursprünglich implantiert wurde. (Bild 6)

Die Pigmentierung nimmt etwa bis zum 20. Kulturtag an Intensität und Ausmaß zu (siehe Bild 7), danach tritt selbst bei einer weiteren Kulturzeit von 50 Tagen keine Veränderung der Intensität der Verfärbung auf.

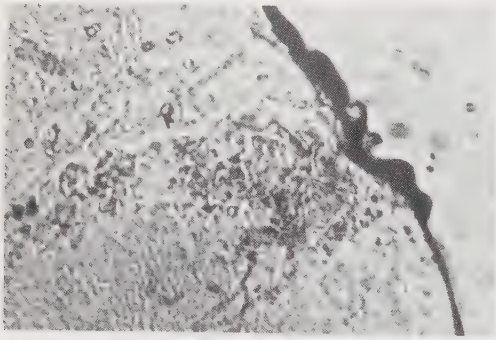

Bild Nr. 6:
Muskelzelle nach Implantation eines Melanomzellkerns (Melanomzellkern lichtmikroskopisch nicht mehr zu lokalisieren), nach zwei Tagen Kulturdauer.
Ungefärbtes Präparat
Vergrößerung 1 : 125 fach

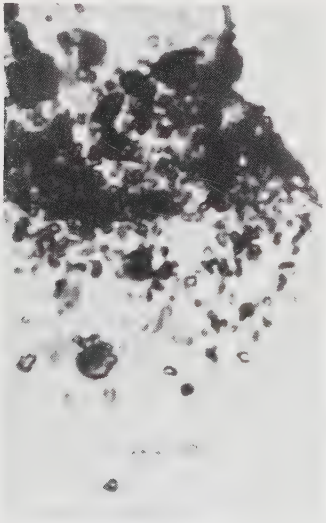

Bild Nr. 7:
Muskelzelle mit implantiertem Melanomzellkern nach einer Kulturdauer von 20 Tagen.
Im oberen Bildabschnitt starke Pigmentbildung;
Ungefärbtes Präparat
Vergrößerung 1 : 125 fach

Zur genauen Analyse der Verfärbung in der Muskelzelle werden elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. (Bilder 8, 9, 10) Diese zeigen, daß es sich bei der Verfärbung nicht um eine diffuse Farbverteilung im Plasma der Muskelzelle handelt, sondern um an Strukturen fixierte Pigmentgranula. Die Pigmentgranula sitzen auf Membranen, die noch von einer gut sichtbaren äußeren Membran umschlossen sind.

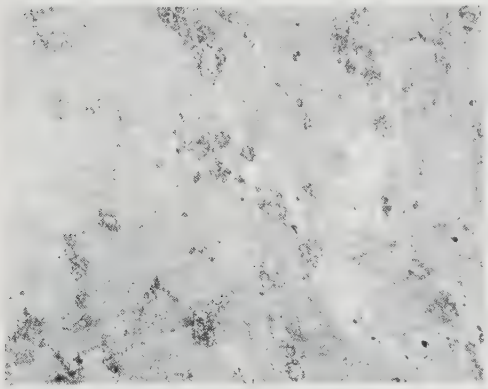

Bild Nr. 8:
Muskelzelle mit Pigmentkörpern
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 4000 fach.

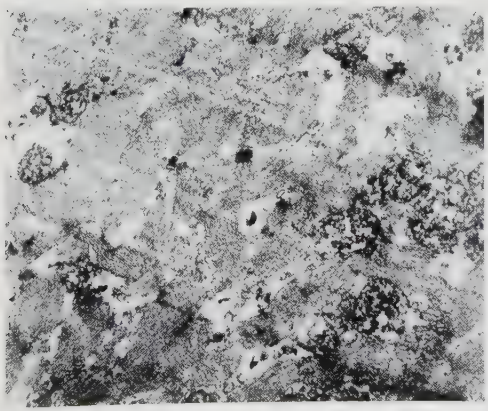

Bild Nr. 9:
Muskelzelle mit Pigmentkörpern
Vergrößerung 1 : 6000 fach.

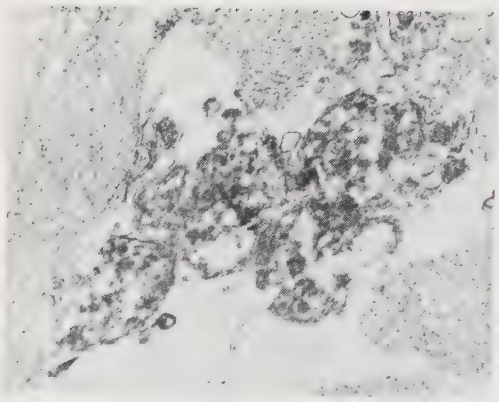

Bild Nr. 10:
Muskelzelle mit Melanosomen (mittlerer Teil des Bildes)
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 12 000 fach

Bei Gegenüberstellung der oben gezeigten Bilder mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Harding-Passey-Melanom-Zellen (Bilder 11, 12, 13), die ebenfalls nur bis zum 20. Kulturtag eine sichtbare Pigmentvermehrung zeigten, sieht man, daß die dort vorkommenden Melanosomen morphologisch vergleichbar sind mit den in der Muskelzelle neu gebildeten Pigmentkörpern.

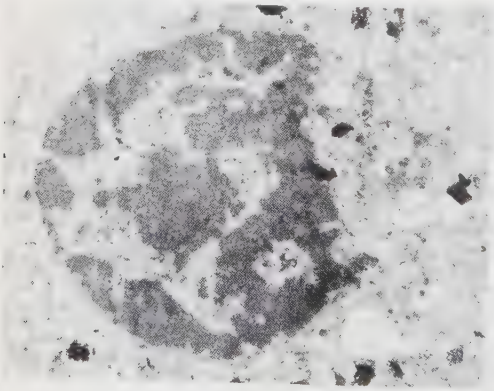

Bild Nr. 11:
Melanomzelle
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 4000 fach

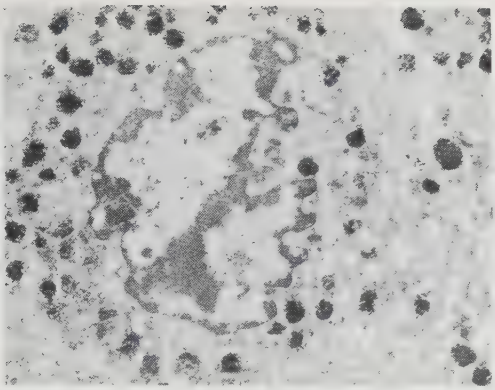

Bild Nr. 12:
Melanomzelle mit Melanosomen
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 4000 fach.

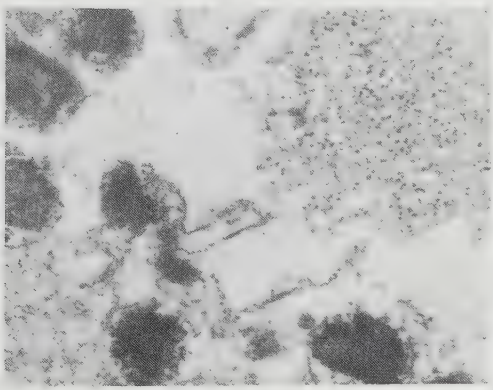

Bild Nr. 13:
Melanosomen einer Melanomzelle
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 12 000 fach.

Gleichzeitig zeigt das am 18. Kulturtag aufgenommene elektronenmikroskopische Bild (Bild 14) den implantierten voll integrierten Zellkern morphologisch unverändert und eine normal gestaltete Muskelzelle (Einstichstelle nicht mehr sichtbar).

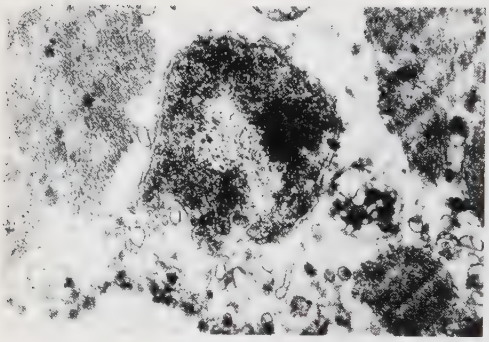

Bild Nr. 14:
Muskelzelle mit einem übertragenen Melanomzellkern .
Elektronenmikroskopische Aufnahme
Vergrößerung 1 : 4000 fach

Von 76 Muskelzellen , in die je ein Melanomzellkern implantiert wurde, zeigten 61 das unter 2.2 beschriebene Verhalten. Als Kontrollversuche werden in Muskelzellen Zellkerne aus EDa-Ascites-Tumorzellen und aus embryonalen Gewebskulturzellen übertragen. Bei diesen Muskelzellen trat keine Pigmentbildung ein.

2.3. Teilungsfähigkeit des übertragenen Zellkerns (Fragestellung 4)

Der Nachweis für die Teilungsfähigkeit des übertragenen Zellkerns in der Mischzelle wird folgendermaßen geführt:

a) Reine lichtmikroskopische Beobachtung des übertragenen Zellkerns in der Mischzelle,

b) Darstellung des spezifischen Markerchromosoms in der Mischzelle,

c) Autoradiographischer Teilungsnachweis.

a) In die zwei Tage nach der Einsaat aus trypsinierten embryonalen Gewebefiltrat entstandenen Riesenzellen (Seite 11) werden Kerne der EDa-Ascitens-Tumorzellen übertragen. Die erste Teilung des übertragenen Zellkernes tritt nach vier Stunden auf. Der Versuch, Abschnitte des Teilungsablaufes photographisch zu zeigen, ist in den Bildern 15, 16 gegeben.

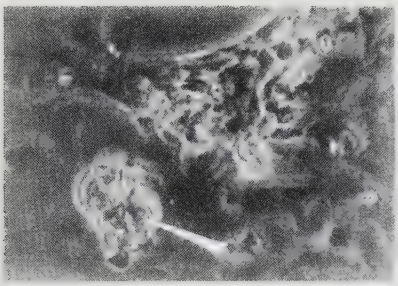

Bild Nr. 15:
Riesenzelle mit übertragenem EDa Zellkern (siehe Pfeil)
sofort nach der Übertragung aufgenommen
(rechter Bildrand zeigt schematische Darstellung von Zelle und übertragenem Kern, erhalten durch Veränderung der Objektebene)
Phasenkontrastaufnahme
Vergrößerung 1 : 125 fach

Bild Nr. 16:
Gleiche Zelle wie in Bild Nr. 15
(Aufgenommen 3 Stunden und 42 Minuten nach der Kernübertragung)
Phasenkontrastaufnahme
Vergrößerung 1 : 125 fach

Da die Bilder 15 und 16 wegen der Zytoplasmaschicht über dem implantierten Zellkern unscharf sind, wird die Zelle für weitere 20 Stunden unter dem Mikroskop gelassen und die nächste Teilung mit Hilfe der Chromosomendarstellung (Seite 15) nachgewiesen. Nach der Überschichtung der Mischzelle mit 10^{-5} molar Colcemid-Lösung für vier Stunden tritt in der anschließenden histologischen Darstellung der Chromosomen in 17 Fällen der 26 übertragenen Kerne das Markerchromosom des Ascites-Tumor EDa auf. Das heißt, 66 % der übertragenen Kerne teilten sich nach 24 Stunden zum zweitenmal. Hierbei muß es sich schon um die zweite Teilung des übertragenen Zellkerns handeln, da die erste Teilung 24 Stunden zuvor unter dem Lichtmikroskop beobachtet wird. Bilder 17, 18 zeigen den normalen Chromosomensatz der embryonalen Mäusezelle und den Chromosomensatz der Ascites-Tumorzelle EDa mit dem Markerchromosom. Bild 19 zeigt das Markerchromosom in einer embryonalen Riesenzelle, nach Übertragung eines EDa Ascites-Tumorzellkerns.

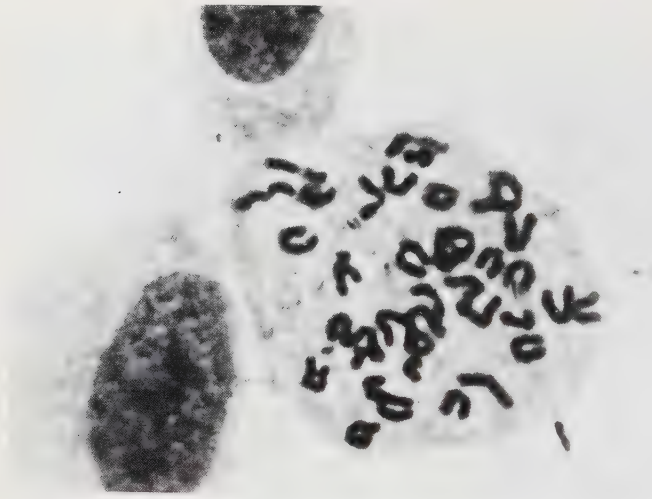

Bild Nr. 17:
Chromosomensatz einer embryonalen Mäusezelle, Vergrößerung: 1 : 1 250 fach, Orcein gefärbt.

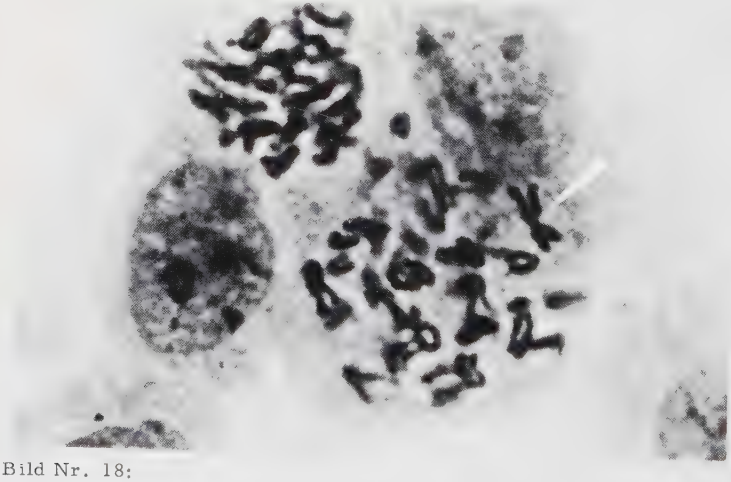

Bild Nr. 18:
Chromosomensatz einer EDa Zelle (Markerchromosom durch Pfeil angezeigt) Vergrößerung 1 : 1250 fach, Orcein gefärbt.

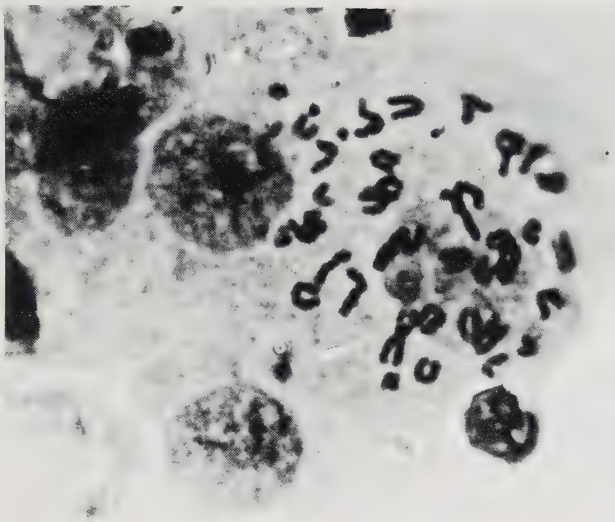

Bild Nr. 19:
Markerchromosom des EDa Chromosomensatzes nach Implantation eines EDa - zellkernes in eine embryonale Riesenzelle. Vergrößerung 1 : 1 250 fach. Orcein gefärbt.

c) Der dritte Nachweis der Teilbarkeit eines implantierten Zellkerns wird durch Übertragung eines ^{3}H Thymidin markierten Zellkerns geführt. Es wird jeweils ein markierter EDa Zellkern mit Hilfe einer Glaskanüle gewonnen und in eine Riesenzelle übertragen. (Methode siehe Seite 15) Nach 20stündiger Kulturzeit bringt man die Zellen durch Behandlung mit einer hypotonen Natriumcitratlösung zum Platzen. Dies ist erforderlich, da bei einer Zelldicke von 20 - 25 mü die Strahlweite des Tritiums zu gering ist, um eindeutige autoradiographische Abbildungen zu geben. [27] Die Bilder 21, 22, 23 zeigen Aufnahmen von Riesenzellen, in die jeweils ein markierter Zellkern übertragen wurde. Durch die Teilung des übertragenen, markierten Zellkerns befinden sich nun in den gespritzten Riesenzellen jeweils zwei markierte Kerne. (Bild Nr. 23)

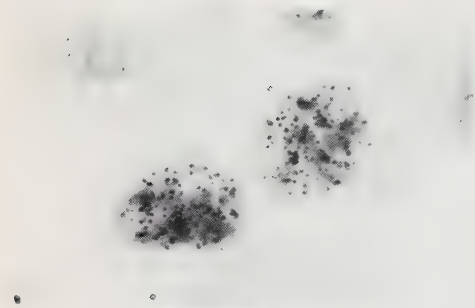

Bild Nr. 20:
EDa-Ascites - Tumorzellen, Zellkerne mit ^{3}H-Thymidin markiert.
Vergrößerung 1:1250 fach
Orcein gefärbt.

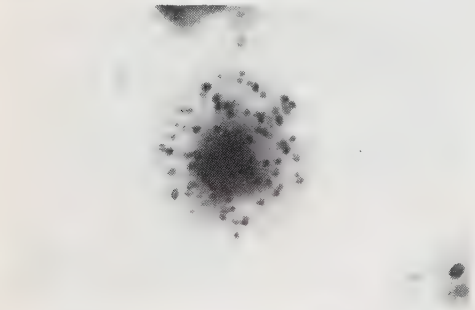

Bild Nr. 21:
Riesenzelle mit übertragenem markiertem EDa-Ascites - Zellkern.
Zelle 10 Minuten nach Kerntransplantation fixiert.
Vergrößerung 1 : 125o fach
Orcein gefärbt.

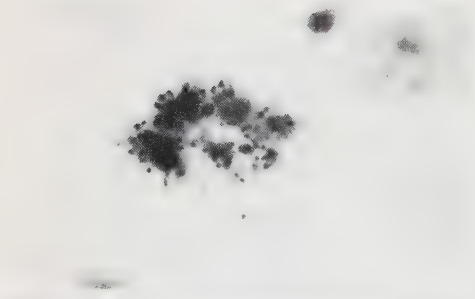

Bild Nr. 22 :
Riesenzelle mit sich in der Teilung befindlichem Ascites -Tumorzellkern. Vier Stunden nach der Übertragung fixiert.
Vergrößerung 1 : 1250 fach
Orcein gefärbt.

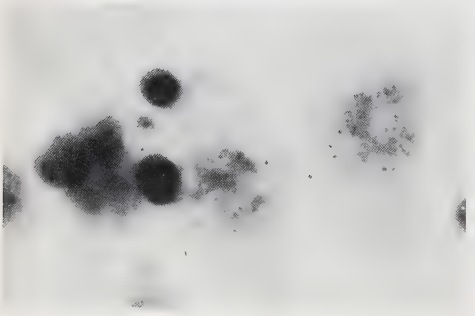

Bild Nr. 23 :
Riesenzelle mit zwei markierten Zellkernen nach der Übertragung eines markierten EDa-Ascites-zellkernes. 20 Stunden nach der Kernübertragung fixiert.
Vergrößerung 1 : 1250 fach
Orcein gefärbt

Die Mischzellen werden in der Kultur nach der Injektion des Zellkernes für 20 Tage in einem Belco-Röhrchen weitergezüchtet. Nach dieser Zeit werden die Zellen mit einem Gummistab vom Objektträger entfernt und in einer Konzentration von $6 \cdot 10^3$ Zellen/ml einer Maus intraperitoneal gespritzt. (Übertragene Menge 2,5ml). Nach einer Wachstumszeit von 30 Tagen entsteht in der Bauchöhle der Maus ein Ascites Tumor, der sich weiter transplantieren läßt. Auch subcutan übertragene 20 Tage alte Kulturen von Mischzellen ergeben nach 15 - 20 Tagen einen soliden Tumor.
Die Chromosomenanalyse des neu entstandenen Tumors ergibt die in Abbildung 3 gezeigte Verteilung der Chromosomenzahl.

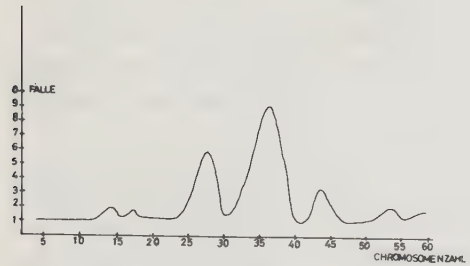

Abb. 3:
Chromosomensatzanalyse des neu entstandenen Tumors. Abszisse: Anzahl der Chromosomen pro Zelle, Ordinate: Anzahl der Fälle.

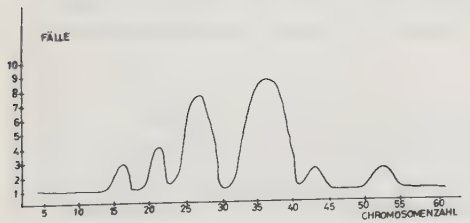

Abb. 4:
Chromosomensatzanalyse des EDa-Ascites-Tumorstammes. Abszisse: Anzahl der Chromosomen pro Zelle, Ordinate: Anzahl der Fälle.

3. Diskussion

Wie man aus den beschriebenen Ergebnissen entnehmen kann, führt die Verletzung an der Zellmembran und dem Zytoplasma der Empfängerzelle (Muskel- und embryonale Riesenzelle), entstanden durch das Anstechen mit der Glaskanüle, zu keiner bleibenden Schädigung dieser Zelle. Die scharf angeschliffene Glaskanüle scheint beim Eindringen in die Zelle deren Bestandteile nur elastisch zu verdrängen und nicht die zellulären Strukturen zu verletzen. Da die Oberfläche der Kanülenspitze durch die Vorbehandlung inaktiviert ist, bleiben bei der Entfernung der Kanüle aus der Zelle keine Zellbestandteile haften.

Nachdem es feststand, daß die Zelle den Einstich mit der Glaskanüle überlebt, wird mit dem Versuch der Implantation von Melanomzellkernen in Muskelzellen bewiesen, daß man Zellkerne somatischer Säugerzellen mittels einer Glaskanüle in andere somatische Säugetierzellen übertragen kann. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Bild Nr. 11, 14) zeigen den implantierten fremden Zellkern morpholigisch unverändert. Weiterhin sieht man, daß das Sarkoplasma im elektronenmikroskopischen Bild des Schnittes nicht ganz bis an den implantierten Melanomzellkern heranreicht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von muskel-eigenen Kernen zeigen gleiche topographische Verhältnisse zwischen Kern und Zytoplasma. Hier scheint es sich um eine Beeinflussung der Anordnung des Kernes zum Plasma durch das Sarkoplasma zu handeln, da der Melanomzellkern in der Melanomzelle (Bild 11) im Zytoplasma anders gelagert ist.

Zum Nachweis der Fortsetzung der zellkern-spezifischen Funktionen in der Mischzelle reichen die bis heute bekannten enzymatischen Nachweismethoden nicht aus. Die Metaboliten eines einzelnen Zellkernes sind analytisch nicht zu messen. [22] Ebensowenig können die in der Zelle synthetisierten Produkte aus einer einzelnen somatischen Zelle quantitativ isoliert aund aufgefangen werden.

Spezifische enzymatische Funktionen könnten durch histochemische Reaktionen beurteilt werden. Dies setzt jedoch einen signifikanten Fermentleistungsunterschied zwischen den gespritzten und zelleigenen Kernen voraus. Weil aber weder bei Harding-Passey-Melanom-Zellen, noch bei Ascites-Tumor-Zellen im Vergleich zu Muskel- und Embryonalzellen für die Histochemie ausreichende Fermentleistungsunterschiede zu finden sind, wird als kernspezifische sichtbare

Funktion die Pigmentbildung der Melanomzelle untersucht.

Die Melaninstrukturen und Melaninpartikel sind charakteristisch für die Zellen dieses Melanomzellstammes (Bild 11, 12, 13)[28]. Das Auftreten von Melanosomen in der Mischzelle ist zu erwarten, wenn die für die Bildung dieser Strukturen verantwortlichen Partikel übertragen werden.

Zwei Tage nach der Übertragung eines Melanomzellkerns in eine Muskelzelle kann die Bildung von Pigmentkörpern in unmittelbarer Umgebung des transplantierten Zellkernes beobachtet werden. Bis zum 20. Kulturtag nimmt die Pigmentierung an Intensität zu. (nur lichtmikroskopisch beobachtet an der Zunahme der Verfärbung der Zelle, da eine quantitative Aussage, wie z. B. Anzahl der neugebildeten Melanosomen zum Plasmavolumen der Zelle folgenden Arbeitsaufwand erfordert: Kontinuierliche elektronenmikroskopische Schnitteserien jeder einzelnen Muskelzelle, das sind etwa 10^3 Schnitte pro Einzelzelle.) Dieses Verhalten beobachtet man auch bei reinen Harding-Passey-Melanom-Kulturen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Melanosomen in der Muskelzelle zeigen an Crista-ähnlichen Membranen Pigmentgranula, die von einer gemeinsamen Membran umgeben sind (Bild 8, 9, 10). In Größe und Aussehen ähneln diese Melanosomen den Mitochondrien [28]. Ob die Muskel-Melanom-Mischzelle die Pigmentgranula an schon vorhandenen Membranen (z. B. den Mitochondrien) oder an neugebildeten Strukturen synthetisiert, kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Bei der Injektion des Zellkernes werden unvermeidlich Teile des endoplasmatischen Retikulums mit übertragen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß geringe Mengen Zytoplasma, Enzyme, m-RNS und Melanosomen an dem übertragenen Zellkern anhaften.

Mit den bisher üblichen Methoden der Zellkernisolierung [29] sind ähnlich reine Präparationen erhalten worden (Bild 2). Diese Zellkerne sind aber "Sicher hochgradig extrahiert" [30].

Der Zellkern besitzt eine Doppelmembran [31, 32], die direkt in die Membran des endoplasmatischen Retikulums übergeht.[33] Ein totales mechanisches Entfernen dieser Membranreste würde die Kernauflösung verursachen[5].

Die mitübertragenen Melanosomen, Enzyme und m-RNS könnten vielleicht die Pigmentgranula synthetisieren. Wenn die Primärstrukturen der Melanosomen Mitochondrien sein sollten [34], könnten sie sich vielleicht wie diese teilen und so zu einer Vermehrung der Pigmentkörper führen. Für diesen Vermehrungsvorgang wäre aber wieder eine Informationsweitergabe des übertragenen Zellkerns notwendig[35].

Die Tatsache, daß es schon nach dem zweiten Kulturtag zur sichtbaren Pigmentbildung im Bereich des übertragenen Zellkerns kommt, erfordert dann aber eine starke Teilungsfrequenz der mitübertragenen Melanosomen. (Die Frage, ob einzelne Melanosomen zu einer solchen Pigmentbildung führen können, ist erst durch den in Vorbereitung stehenden Versuch der singulären Übertragung eines Melanosoms mit einer Glaskanüle zu beantworten.)

Die Pigmentierung der Mischzelle, hervorgerufen, durch eventuell mitübertragene m-RNS und Enzyme ist, wegen der Form in der die Veränderung in der Muskelzelle räumlich und zeitlich auftritt, unwahrscheinlich. Eine,bei der Transplantation mitgeschleppte, m-RNS kann über eine Zeitspanne von 20 Tager nicht wirksam sein, da ihre Lebensdauer sehr kurz ist[36]. Die Enzyme müßten auf Grund einer Verdünnung im Zytoplasma der Muskelzelle eine gleichmäßige verteilte Pigmentierung und nicht wie beobachtet, eine vom Kern ausgehende konzentrische Pigmentbildung herbeiführen.

Nach den diskutierten Möglichkeiten zu urteilen, ist die Information aus dem übertragenen Zellkern, der alleinige Faktor für die Pigmentneubildung in der Mischzelle.

Eine Teilung des Melanomzellkerns in der Muskelzelle wird weder lichtmikroskopisch noch elektronenmikroskopisch beobachtet. Der autoradiographische Nachweis einer Neosynthese von DNS im transplantierten Melanomzellkern gelingtnicht. Das hat allein technische Gründe. Die ß-Strahlung des ^{3}H wird durch die,über dem Kern liegende Sarkoplasmaschicht (15 - 20 mü), absorbiert. Ähnliche Schwierigkeiten beschreibt Harris [37] beim autoradiographischem Nachweis der ^{3}H Markierung bei Makrophagen, deren Stärke in Kultur nur 5 - 6 mü beträgt.

Der Nachweis eventueller Malignität der artifiziellen Mischzelle ist nur durch das Wachstumsverhalten der Tochtergeneration dieser Mischzelle möglich. Das setzt die Teilung des übertragenen Kernes voraus, die auf drei Wegen dokumentiert wird.

Einmal wird die Kernteilung des in die Riesenzelle gespritzten Ascites-Tumorzellkerns lichtmikroskopisch beobachtet. Schon vier Stunden nach der Transplantation des Zellkerns tritt die erste Kernteilung auf. Diese verfrüht eintretende Mitose nach Verletzung der Zelle beobachteten schon mehrere Autoren [5] nach Amputationen und Incisuren an Fibroplasten in Kultur. Nach einer normalen Generationsdauer von 24-25 Stunden erfolgt die zweite Teilung.

Die photographische Dokumentation des Kernteilungsablaufes in der Riesenzelle ist unbefriedigend. Der Kern ist von einer 6 - 10 mü starken Schicht Zytoplasma überlagert. Diese verhindert eine gleichzeitige für die photographische Auflösung günstige Einstellung von Kern und Zelle und führt zu unscharfen Bildern. Hier ist die Beobachtung durch das Auge, bei der die Objektebenen variiert werden könne, der photographischen Aufnahme überlegen (siehe Seite 23). Zur besseren Demonstration der Teilbarkeit des übertragenen Zellkerns wird die Darstellung des Markerchromosoms des EDa-Zellkerns in der Mischzelle verwendet (siehe Seite 25). Chromosomen von somatischen Zellen sind nur während der Teilung zu erfassen. Da nur Interphasekerne übertragen werden, beweist das Auftreten des Markerchromosoms in der Mischzelle die Teilung des transplantierten EDa-Kernes.

Häufig treten in Zellkulturen nach längerer Kulturzeit chromosomale Abnormitäten als Folge der fortgesetzten Vermehrung in vitro und als Begleiterscheinung der Umwandlung in einen permanenten Zellstamm[38]. Von mir verwendete Empfängerzellen gehören keinem permanentem Zellstamm an, die Zellen werden am zweiten Kulturtag gespritzt. Etwa 1000 von mir untersuchte Chromosomensätze von embryonalen Kulturzellen (vier Tage alte Kulturen) zeigen zwar ganz selten Abweichungen in der Chromosomenzahl, aber in keinem beobachteten Fall eine Formveränderung eines Chromosoms, (BildNr. 17). Neben dem Nachweis der Teilung des transplantierten Zellkernes in der Mischzelle durch lichtmikroskopische Beobachtung und durch Chromosomensatzanalyse führt auch die autoradiographische Verfolgung des markierten übertragenen Zellkernes zu den gleichen Ergebnissen. Als Nebenbefund fand sich, daß im Gegensatz zu einigen Aufnahmen der Hybridisierungsprodukte von Harris [37] mit Hilfe von Sendai-Viren kein räumlicher Kontakt zwischen den beiden Zellkernarten nachzuweisen ist. Ob dies ein prinzipiell anderes Verhalten ist oder auf die Vorbe-

handlung der Zelle mit hypotoner Lösung zurückzuführen ist, die den Zellverband lockert und die Zellkerne auseinander rücken läßt, kann nicht genau gesagt werden. Auch der Befund, daß die Tochtergenerationen der Mischzelle, entstanden nach Transplantation in die Bauchhöhle von Mäusen, nur den Chromosomensatz des Spenderzellkerns enthält, spricht dafür, daß hier ein prinzipiell anderes Teilungsverhalten vorliegt, als bei den Mischzellen nach Hybridisierung[37].

Die Tatsache, daß die intraperitoneale oder subcutane Injektion von etwa 20 Tage alten Kulturen embryonaler Mäusezellen (10^6 Zellen) in Mäusen zu keinem Tumor führen, während die Injektion des Kulturansatzes mit der Mischzelle (gesamte implantierte Zellzahl $1,5 \times 10^4$) einen weiter subcutan und intraperitoneal transplantierbaren Zellstamm ergibt, weist darauf hin, daß die Eigenschaft des neoplastischen Wachstums in engem Zusammenhang mit der Informationsspeicherung der Malignität im übertragenen Zellkern steht. Ob sich dieser Zellstamm von dem EDa-Zellstamm unterscheidet, insbesondere was seine Malignität angeht kann bisher nicht gesagt werden.

Die Methode der mikrochirurgischen Transplantation von Zellbestandteilen eröffnet die Möglichkeit neben den hier angedeuteten Problemen weitere Gebiete der molekularen Genetik somatischer Zellen zu behandeln, die bisher mit Aussicht auf Erfolg nur bei nicht kernhaltigen Organismen bearbeitet werden. Die in letzter Zeit erhaltenen Befunde [37] sprechen dafür, daß die bei Bakterien festgestellten Mechanismen, insbesondere der Replikation des genetischen Materials und die Regulation dieser Vorgänge nicht ohne Einschränkungen auf kernhaltige Zellen zu übertragen sind.

4. Zusammenfassung

Zellkerne aus somatischen Säugetierzellen lassen sich mit Hilfe von Glaskanülen isolieren und in eine andere somatische Säugetierzelle übertragen. Die Zellkerne setzen in den Mischzellen ihre spezifischen Funktionen fort und teilen sich weiter. Die Tochergenerationen aus einer Mischzelle entstanden aus embryonaler Riesenzelle und dem Zellkern einer EDa Ascites-Tumorzelle wachsen nach Transplantation in die Bauchhöhle einer Maus als Tumor weiter.

5. Literaturverzeichnis.

(1) Harris, H. , Watkin, J.F., Nature 205 640 (1965)

(2) Barski, G. , Sorieul, S., Cornefert, F., J. Nat. Cancer Inst. 26 1269 (1961)

(3) Kopac, M. ,Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 1219 (1956)

(4) Kopac, M. ,Ann. N.Y. Acad. Sci. 68 380 (1957)

(5) Peterfi, T., Olivo, O. , Arch. exptl. Zellforschung 4 149 (1927)

(6) Munro, T.R., Daniel, M.R. , Exp. Cell Res. 38 483 (1965)

(7) Goldstein, L. Cailleau, R., Crocker, T.T. , Exp. Cell Res. 19 332 (1960)

(8) Barski, G., Belehradek, J. Jr. , Exp. Cell Res. 29 102 (1963)

(9) Briggs, R., King, T.J., Proc. Natl. Acad. Sci. 38 455 (1952)

(10) Gurdon, J.B., Uehlinger, V., Nature 210 1240 (1966)

(11) Defendi, V. , Ephrussi, B., Koprowski, H., Yoshida, M.C., Proc. Nat. Acad. Sci. 57 299 (1967)

(12) Carter , S. B., :Exp. Cell Res. 42 395 (1966)

(13) Gilbert, P.T. Jr., Science 114 637 (1951)

(14) Schindler, R., "Die tierische Zelle in Zellkultur" , S. 3 , Recent Results in Cancer Research. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York . 1965.

(15) Dulbecco, R. , Proc. Nat. Acad. Sci. 38 747 (1952)

(16) Puck, T.T., Cieciura, S.J. , Robinson, A. , J. expt. Med. 108 945 (1958)

(17) Eagle, H. , J. Biol. Chem. 214 839 (1955) ,Kennzeichnung nach Difco-Code.

(18) Hanks, J.H. , J. Cell Comp. Physiol. 31 235 (1948)

(19) Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F. Manometric Techniques Burgess Publishing Co, Minneapolis , Third Edition , S. 149

(20) Simms, H.S., Stillman, N.P. , J. Gen. Physiol. 20 603 (1937)

(21) Edwards, G.A., Fogh, J. Cancer Res. 19 608 (1959)

(22) Siebert, G. , Nuclear Enzymes. Methods in Cancer Research Vol. III Ed. Busch, H., Acad. Press, New York, London, 1967

(23) Stubblefield, E., Klevecz, R., Exp. Cell Res. 40 660 (1965)

(24) Lüers, T. , Z. nat. wiss. med. Grundlagenforschung 2 1 (1964)

(25) Regan, J.D., Chu, E.H.Y. , J. Cell Biol. 281 139 (1966)

(26) Rogers, A.W., Techniques of Autoradiography. Elsevier Publ. Comp. , Amsterdam, London , New York, 1967.

(27) Wenzel, M. , Schulze, P.E., Tritium-Markierung. Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1962, S.151.

(28) Della Porta, G., Mühlsack, O., Strukture and Control of the Melanocytes. Springer Verlag, Berlin , Heidelberg, New York, 1966.

(29) Chauveau, J. , Moule, Y. , Rouillier, C., Exp. Cell Res. 11 317 (1956)

(30) Siebert, G. Diskussionsbeitrag "Wirkung der Hormone auf den Zellkern", (Sekeris, C.E.), 18. Colloquium d. Gesellschaft für Physiol. Chem. , "Wirkungsmechanismen der Hormone". Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967.

(31) Hartmann, J.F., J. Comp. Neurol. 99 201 (1953)

(32) Watson, M.L., J. Biophys. Biochem. Cytol. 1 257 (1955)

(33) Ruska, H. , Marburger Sitzungsberichte 82 3 (1960)

(34) Lehninger, A.L., The Mitochondrien , Benjamin W. A. Inc. New York , 1964 S. 234.

(35) Roodyn, D.B., Wilkie, D. The Biogenesis of Mitochondria. Gen. Ed. Mellanby, K.. Methuen's Monographs on Biological Subjects. Methuen and Co. Ltd. London 1968.

(36) Jacob, F. , Monod, J. , J. Mol. Biol. 3 318 (1961)

(37) Harris, H., Watkins, J.F., Ford, C.E., Schoefl, G.I., J. Cell Sci. 1 1 (1966)

(38) Schindler, R. , "Die tierische Zelle in Zellkultur" . Recent Results in Cancer Research. Springer -Verlag, Berlin Heidelberg, New York 1965.

(39) Gurdon, J.B. Endeavour, 25 95 (1966)

Lebenslauf

Zur Person:

Adolf Gräßmann, geb. 20. 4. 1938 in Bad Kissingen.
Vater: Hans Gräßmann, Beruf: Portier
Mutter: Käthe Gräßmann geb. Mezner Beruf: Hausfrau

Schule und Ausbildung:

Volksschule: von 1944 - 1952 in Bad Kissingen;
von 1952 bis 1954 arbeitete ich als Hilfsarbeiter bei der Firma SKF Kugellager Fabriken GmbH in Schweinfurth;
von 1954 bis 1958 war ich als Maschinenschlosserlehrling bei der oben genannten Firma eingestellt.
Im Frühjahr 1958 legte ich die Facharbeiterprüfung vor der Industrie - und Handelskammer Unterfranken mit Auszeichnung ab.
Militärzeit: als Wehrpflichtiger war ich vom 1. 1. 1959 bis zum 31. 12. 1959 bei der Luftwaffe eingezogen.
1960 bis 1962 besuchte ich die Private Abendoberschule Dr. Stachowiak in Berlin, während dieser Zeit arbeitete ich tagsüber bei der Firma SKF Büro Berlin.
Die Reifeprüfung legte ich im April 1962 ab - als Schulfremder vor dem Senator für Volksbildung in Berlin -.

Studium:

Im Sommersemester 1962 immatrikulierte ich mich als Student der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Vorphysikum: SS 1963
Physikum: WS 1964
Staatsexamen: WS 1967